

Kwantitering in de bloedstolling

Citation for published version (APA):

Hemker, H. C. (1964). Kwantitering in de bloedstolling. *Maandschrift voor kindergeneeskunde*, 22, 503-511.

Document status and date:

Published: 01/01/1964

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

04

OVERDRUK
UIT
MAANDSCHRIFT VOOR KINDERGENEESKUNDE
vol. nr. 22.
UITGAVE VAN
H. E. STENFERT KROESE - LEIDEN

KWANTITERING IN DE BLOEDSTOLLING

DOOR

DR. H. C. HEMKER *

Het onderzoek op het gebied van de bloedstolling staat in een kwade reuk. Zowel medici als biochemici zijn over het algemeen van mening, dat een chaotische hoeveelheid stollingsfactoren op chaotische wijze door een aantal monomanen bestudeerd wordt en trekken daaruit de conclusie, dat zij het onderwerp terzijde kunnen laten. Toch moet het mogelijk zijn vanuit onze huidige fragmentarische kennis een eenvoudig en begrijpelijk beeld van de stollingsfysiologie te ontwerpen. Een dergelijk beeld moet bestaan uit postulaten die het reactiemechanisme van de bloedstolling schetsen. Geen van deze postulaten moet overbodig zijn, maar tezamen moeten zij de bekende verschijnselen kunnen verklaren. Een dergelijk stelsel van onderstellingen zal dan zijn deugdelijkheid moeten bewijzen; en wel doordat het naast een kwalitatieve interpretatie van de proefresultaten (zoals b.v. correctie van een deficiënt plasma door een ander deficiënt plasma), ook een interpretatie in kwantitatieve zin mogelijk maakt; dat wil dus zeggen een interpretatie die antwoord geeft op de vraag: 'wat is de wetmatigheid die ten grondslag ligt aan de variatie van de stollingstijd met de concentratie van een stollingsfactor?' Wij zullen ons hier beperken tot het schetsen van enkele aspecten van het zoeken naar dergelijke wetmatigheden in het zogenaamde 'extrinsic system' van de bloedstolling: het stollingsmechanisme, waarin de eiwitfactoren I, II, V, VII en X tezamen met weefselbestanddelen reageren tot uiteindelijk fibrine gevormd is. De kwalitatieve onderstellingen (no. 1 en 2) zijn voornamelijk gebaseerd op het werk van BIGGS, MACFARLANE, ESNOUF e.a. (1, 2, 3). De naamgeving is die voorgesteld door het International Committee on the nomenclature of bloodclotting factors.

Onderstelling I

Het stollingsproces voltrekt zich als een keten van proteolytische reacties, en wel zo, dat het produkt van de eerste reactie een enzym is, dat de tweede reactie in gang zet, etc.

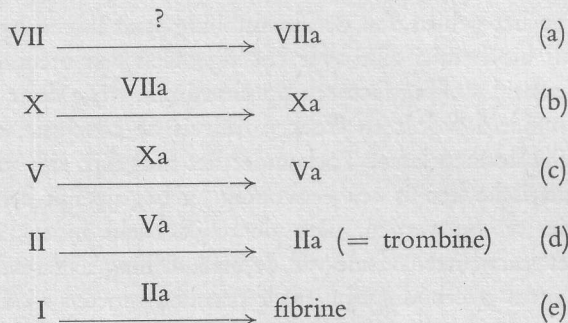
Op deze wijze wordt dus iedere in het plasma aanwezige stollingsfactor omgezet in zijn geactiveerde vorm. De geactiveerde vorm duiden wij aan

* Uit de Afdeling Hematologie van de Interne Kliniek van het Academisch Ziekenhuis te Leiden (Hoofd: Prof. Dr. J. MULDER).

met de index a. Ca^{++} ionen zijn voor dit proces noodzakelijk. De weefsel-factoren hebben een katalytische (mogelijk oppervlakte katalytische) functie.

Onderstelling II

Het reactiemechanisme van het extrinsieke stollingsproces betreft de factoren I, II, V, VII en X die als volgt tezamen reageren:



Verfijningen van dit schema, die b.v. de inactivering van Va en IIa zouden verklaren, zullen wij buiten beschouwing laten.

Onderstelling III

De stollingssnelheid varieert omgekeerd evenredig met de stollingstijd.

Algemeen wordt aangenomen, dat de eerste polymerisatie van het fibrine-monomeer een niet-enzymatisch proces is. Deze polymerisatie zal dus optreden zodra de gemiddelde onderlinge afstand der monomeren een kritische grenswaarde overschrijdt. Dit wil zeggen: zodra er een kritische *concentratie* fibrine monomeer is bereikt. Het is logisch te bedenken, dat bij een verdubbelde stollingssnelheid deze concentratie — die immers bij gelijke temperatuur, pH, ionensterkte etc. gelijk is — in een tweemaal zo kleine tijd bereikt wordt. In het algemeen dus: dat de stollingssnelheid omgekeerd evenredig is aan de stollingstijd.

Onderstelling IV

De stollingssnelheid in een systeem waarin één factor (als beperkende factor) in wisselende kleine concentraties aanwezig is, en andere factoren in overmaat, is recht evenredig met de snelheid van de reactie waarin de beperkende factor fungeert.

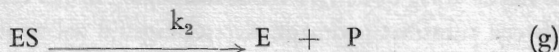
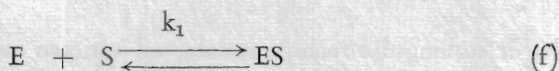
Er zijn weinig argumenten aan te voeren om deze onderstelling te steunen. Immers, de snelheid van een enzym-produktie als functie van de tijd zal

geïntegreerd moeten worden, wil men de functie van substraatproductie tegen de tijd weten. Als het substraat weer een enzym is, is hernieuwde integratie noodzakelijk. Dit zou inhouden, dat de uiteindelijke snelheid van fibrinevorming op zeer ingewikkelde wijze van b.v. de factor X omzetting afhangt. In de praktijk echter blijkt het mogelijk deze complicaties terzijde te laten; misschien wel juist omdat wij de stollingsnelheid als omgekeerde van de stollingstijd meten. Zonder dat dus deze hypothese van enig inzicht in het reactiemechanisme getuigt, is het een noodzakelijke onderstelling als men tot kwantitering van zijn proefresultaten wil komen. Gelukkig is de hypothese tot nu toe nog niet weerlegd door de uitkomsten van onze proeven.

Onderstelling V

Het standaardmodel van de enzym-kinetica (zie b.v. 4 en 5) is op de reacties binnen het stollingsproces van toepassing. Aan de voorwaarden voor de geldigheid van de Michaelis-Menten formule is in een stollingsproef voldaan; met uitzondering van één, er is n.l. onder onze omstandigheden waarschijnlijk nooit een overmaat substraat t.o.v. de beschikbare hoeveelheid enzym in het reactiemedium aanwezig.

De onderstelling houdt in, dat wij het reactiemechanisme van één stap schrijven als:



Waarin: E = enzym; S = substraat; ES = enzymsubstraat complex;
P = produkt.

Waarna wij, uitgaande van de onderstelling dat de hoeveelheid ES in de opgang zijnde reactie onder onze proefomstandigheden constant is, kunnen stellen:

$$\frac{d ES}{dt} = k_1 [E] \cdot [S] - k_{-1} [ES] - k_2 [ES] = 0 \quad (1)$$

$$v = \frac{d [P]}{dt} = k_2 [ES] \quad (2)$$

Hierin is: v = reactiesnelheid; $[E]$ = concentratie vrij enzym; $[S]$ = concentratie vrij substraat; $[ES]$ = concentratie enzymsubstraat complex; stel verder dat: $[Et]$ = de totale hoeveelheid enzym die

in de proef aanwezig is, en $[St]$ = de totale hoeveelheid substraat die aanwezig is, dan geldt:

$$Et = [E] + [ES] \quad (3)$$

$$St = [S] + [ES] \quad (4)$$

Uit deze formules (1, 2, 3, 4) laat zich afleiden, dat:

$$\frac{k_2}{v} = \frac{1}{[E]} + \frac{1}{[S]} + \frac{K}{[E] \cdot [S]} \quad (5)$$

(waarin $K = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$)

Omdat wij ondersteld hebben, dat $\frac{1}{v}$ evenredig is met t (t = stollingstijd), kunnen wij deze formule schrijven als:

$$t.h. = \frac{1}{[E]} + \frac{1}{[S]} + \frac{K}{[E] \cdot [S]} \quad (6)$$

(h = constante)

Dit leert ons, dat de stollingstijd recht evenredig zal variëren met $1/S$ als E constant is en met $1/E$ als S constant is.

Onafhankelijk van de vraag of de variërende factor zich in het testsysteem als een enzym of als een substraat gedraagt, de stollingstijd zal recht evenredig moeten variëren met het omgekeerde van de concentratie van de te testen factor.

Dan is nu het moment gekomen waarop ons stelsel van hypothesen aan de praktijk getoetst moet worden. In een testsysteem voor factor II, bereid als beschreven door LOELIGER e.a., voegen wij van 2 % tot 10 % protrombine in de vorm van verdunningen van normaal plasma toe en meten de stollings-tijden (6).¹ Om enige betrouwbaarheid van de verkregen getallen te waarborgen werden plasma's getest van 110 verschillende normalen, zowel individueel als gepooled. Tevens werd 51 maal de zgn. leeg-waarde gemeten. Onder leeg-waarde verstaan wij de stollingstijd van het reagens waaraan geen verdunning van normaal plasma is toegevoegd, maar alleen de verdunnings-vloeistof.

De resultaten zijn vermeld in tabel I.

¹ Onze dank gaat uit naar collega J. v. D. MEER, die deze bepalingen uitvoerde in het kader van een groter onderzoek.

TABEL I TABLE I

Het verband tussen stollingstijd en protrombine-concentratie
Relation between clotting time and prothrombine level

% toegevoegd added	n	t (sec.)	% aanwezig present
10	395	22.4 \pm 0.1	11.33
5	182	27.0 \pm 0.3	6.33
4	29	29.6 \pm 1.0	5.33
3,33	49	31.0 \pm 0.6	4.66
2,5	90	33.8 \pm 0.5	3.83
2	312	36.5 \pm 0.4	3.33
0	51	67.2 \pm 2.2	1.33

Kolom 1 geeft de hoeveelheid factor II toegevoegd aan factor II-reagens in de vorm van normaal plasma, kolom 2 geeft het aantal waarnemingen. Kolom 3 de stollingstijd met het 95 % betrouwbaarheids-interval en kolom 4 de hoe-

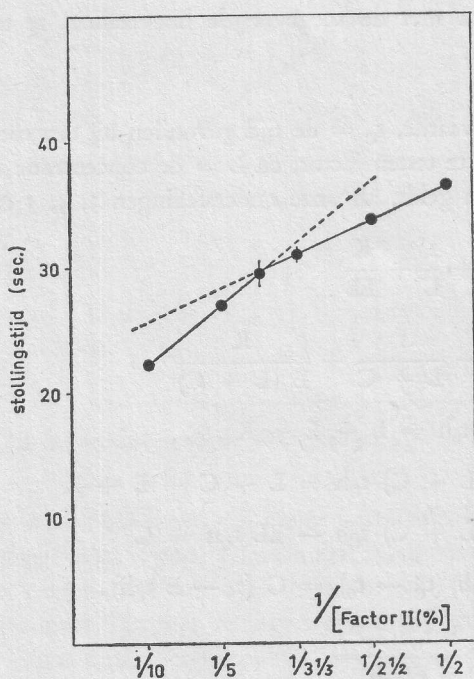


Fig. 1. Verband tussen stollingstijd en toegevoegde concentratie factor II. Viermaal de standaardfout van het gemiddelde is aangeduid als een verticaal lijnstuk door de punten, tenzij dit lijnstuk kleiner was dan de doorsnede van het punt

veelheid factoren, zoals die in de proef aanwezig waren; berekend zoals in de tekst aangeduid. Reactiemedium: 0.1 ml factor II reagens; 0.1 ml weefsel-factoren (vgl. OWREN en AAS, 7); 0.1 ml normaal plasma verdund met Michaelisbuffer pH 7.4; 0.1 ml Ba SO₄-geabsorbeerd osseplasma; 0.1 ml Ca Cl₂ 50 mM.

Als wij de waarden aangegeven in kolom 1 en 3 van deze tabel in grafiek brengen op een wijze, die volgens formule (6) een rechte moet opleveren, n.l. door langs de x-as het omgekeerde van de concentratie af te zetten tegen de stollingstijd op de y-as, dan zien wij dat er geen rechte blijkt te ontstaan (fig. 1).

Op grond hiervan zouden wij onze hypothesen kunnen verlaten. Wij kunnen echter ook onderzoeken, of wij de complicerende factor kunnen vinden die het afwijken van een rechte verklaart en het daardoor mogelijk maakt onze hypothesen te handhaven.

Uit tabel 1 zien wij dat ook als er 0 % factoren is toegevoegd, binnen relatief korte tijd stolling optreedt. Dit brengt ons tot de volgende onderstelling.

Onderstelling VI

Het reagens bevat een niet te verwaarlozen hoeveelheid van de te testen factor, dat tezamen met de toegevoegde hoeveelheid van deze factor de stollingstijd bepaalt.

Stel t_0 = de leeg-waarde, t_c = de tijd gevonden bij een toegevoegde concentratie C van de te testen factor, en L = de concentratie van deze factor in het reagens. Dan geldt, als onze onderstellingen 3, 4, 5 en 6 juist zijn¹:

$$t_0 h = \frac{1}{E} + \frac{1}{L} + \frac{K}{EL} \quad (7)$$

$$t_c h = \frac{1}{E} + \frac{1}{L + C} + \frac{K}{E(L + C)} \quad (8)$$

$$(7) \rightarrow EL t_0 h = L + E + K \quad (9)$$

$$(8) \rightarrow E(L + C) t_c h = L + C + E + K \quad (10)$$

$$(10) - (9) \rightarrow E(L + C) t_c h - EL t_0 h = C \quad (11)$$

$$\rightarrow EL h (t_c - t_0) = C (1 - E t_c h) \quad (12)$$

$$\frac{t_0 - t_c}{C} = \frac{E t_c h - 1}{EL h} \quad (13)$$

¹ Om de overzichtelijkheid te bevorderen zijn hier de concentratiehaken weggelaten; voor E lezen men (E) etc.

$$\frac{t_0 - t_c}{C} = \frac{1}{L} \cdot t_c - \frac{1}{E.l.h} \quad (14)$$

$$t_c = L \cdot \frac{t_0 - t_c}{C} + \frac{1}{E.l.h} \quad (15)$$

Dit is een heel bruikbare formule; zij leert ons hoe het verschil tussen leegwaarden en gevonden tijd, gedeeld door de *toegevoegde* concentratie van de te testen factor, lineair zal variëren met de bij de concentratie behorende stollingstijd. Fig. 2 laat zien dat dit inderdaad het geval is.

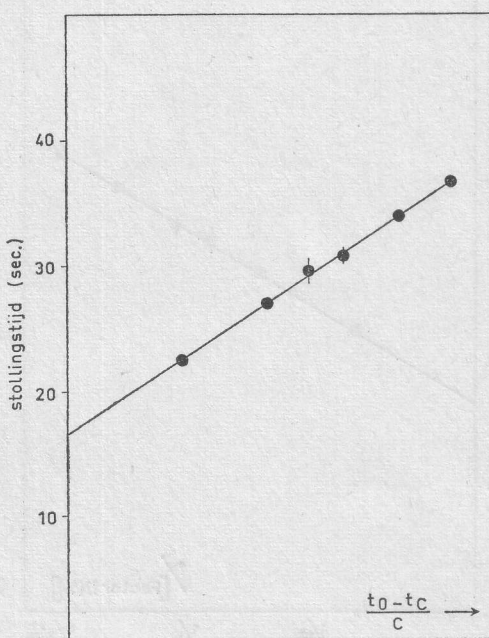


Fig. 2. Verband tussen de stollingstijd en $(t_0 - t_c):C$. (zie tekst)

Maar de formule leert ons meer; wij kunnen eruit afleiden, dat de helling van de lijn in fig. 2 een maat is voor $1/L$, dus een maat voor de concentratie van factor II in het reagens. De term $1/EL h$ uit formule (15) geeft het intercept (M) van de gevonden lijn met de y-as weer. Is dit eenmaal gevonden dan kan men de leeg-waarde berekenen uit de formule (afgeleid uit 15):

$$L = \frac{t_c - M}{t_0 - t_c} \cdot C. \quad (16)$$

Dit maakt het nauwkeurig meten van de zeer kleine hoeveelheden van een stollingsfactor, die in het „reagens” aanwezig zijn mogelijk. Ons artificiële factor II reagens bevatte 1.33 %, en het plasma van een lijder aan ernstige congenitale hypoprotrombinemie (7) bevatte 1.51 % protrombine; terwijl bij een lijder aan ernstige hypoproconvertinemie 1.46 % proconvertine in het plasma werd gevonden ($2 \times$).

Als proef op de som zien wij in fig. 3 hoe de stollingstijd, uitgezet tegen de ware concentratie factor II (berekend als de toegevoegde hoeveelheid plus de in het reagens aanwezige hoeveelheid) wel een rechte oplevert (zie ook kolom 4 van tabel 1).

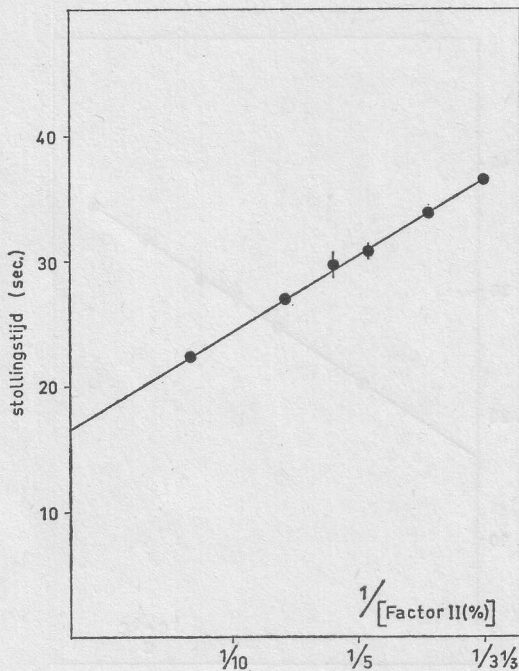


Fig. 3. Verband tussen stollingstijd en in het reactiemengsel aanwezige hoeveelheid factor II

Ook voor factor VII bleek een dergelijk verband te vinden, en voorlopige proefresultaten duiden aan, dat ook de factoren V en X zich op deze wijze kwantitatief laten benaderen.

Concluderend mogen wij zeggen, dat onze proefresultaten met de gestelde hypothesen niet in strijd zijn; hetgeen ons doet vermoeden, dat deze onderstellingen geschikt zijn als een eerste basis voor een exacte benadering van de stollingskinetica.

Wij kunnen slechts hopen, dat in de toekomst vele onverwachte proefresultaten ons ertoe zullen nopen het geschetste beeld te wijzigen, uit te breiden en te verfijnen, om aldus ons inzicht in het probleem van de bloedstolling te verdiepen.

SAMENVATTING

Aan de hand van een stelsel van hypothesen wordt een methode ontworpen om reacties tussen stollingsfactoren op een enzymkinetisch exacte wijze te benaderen. Deze methode wordt getoetst op de uitkomsten van de bepaling van een standaardcurve voor een factor II reagens.

SUMMARY

Reactions with bloodclotting factors thus far escaped exact kinetic treatment. In this article a set of assumptions is exposed that can lead to the enzyme kinetics of the interaction of clotting factors. These assumptions can be summarized as follows:

The clotting factors VII, X, V, II and I react subsequently in a chain of proteolytic interactions, the reaction-velocity is dependent upon the factor that is present in a limiting amount and can be measured as the inverse of the clotting time. In this system Michaelis-Menten Kinetics, apply, but a correction has to be carried out for the amount of substrate present in the reagent. Formulas are derived to effectuate this correction. When these formulas are applied to the results obtained in a system where factor II varies, a straight line is indeed obtained in the Lineweaver-Burk plot. This strongly supports the validity of our assumptions. It is shown that reagents obtained from congenitally or artificially deficient plasmas contain a relatively large residual amount (1 to 2 %) of the factors to be tested.

LITERATUUR

1. BIGGS, R. and R. G. MACFARLANE, Human blood coagulation, p. 20 e.v., Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1962.
2. ESNOUF, M. P. and W. J. WILLIAMS, *Biochem. J.* 84: 62, 1962.
3. ESNOUF, M. P., F. JOBIN, and J. C. PEDEN, *Proc. Biochem. Soc.* 430, 1963.
4. DIXON, M. and E. C. WEBB, *Enzymes*, p. 62 e.v., Longmans Green and Co., London, 1958.
5. REINER, JOHN M., Behaviour of enzyme systems, Burgess Publishing Company, Minneapolis, 1959.
6. LOELIGER, E. A., B. VAN DER ESCH, M. J. MATTERN et A. S. A. DEN BRABANDER, *Thrombosis et Diath. Haemorrhagica* 9: 74, 1963.
7. VAN CREVELD, S., *Acta paediatrica* 43, 245, suppl. 100, 1954.